

# افزایش تولید کوآنزیم Q<sub>10</sub> توسط *Gluconobacter oxydans* H621 از راه جهش شیمیایی و بررسی اثر جهش زایی نیتروزوگوانیدین با استفاده از روش سطح پاسخ

فوزیه مقدمی<sup>۱\*</sup>، مهدی کلانتری<sup>۲</sup>

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

۲- گروه آمار، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

\*نویسنده مسئول: fmoghadami@pnu.ac.ir

صندوق پستی: ۴۶۹۷-۱۹۳۹۵

پذیرش: ۱۴۰۰/۶/۲۹

دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۱۲

## چکیده

ایجاد جهش در سویه‌های میکروبی برای افزایش تولید کوآنزیم Q<sub>10</sub> یکی از راهکارهای موفق برای توسعه سویه می‌باشد. از این رو در این پژوهش تولید کوآنزیم Q<sub>10</sub> به‌وسیله *Gluconobacter oxydans* H621 از راه ایجاد جهش شیمیایی با ماده نیتروزوگوانیدین با استفاده از روش سطح پاسخ بررسی شده است. برای ایجاد جهش از ماده نیتروزوگوانیدین در غلظت‌ها (۴/۲۱ - ۲/۷۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و زمان‌های مختلف تیمار (۳۳/۱۲ - ۱۱/۸۹ دقیقه) استفاده شد که به‌وسیله یک طرح مرکب مرکزی طراحی شده بود. تشخیص سویه‌های جهش‌یافته از راه قابلیت رشد در محیط حاوی ۱۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر منادیون انجام گرفت. سپس سویه‌های جهش‌یافته از لحاظ تولید کوآنزیم Q<sub>10</sub> و وزن خشک سلولی بررسی شدند. نتایج نشان داد که در غلظت ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از نیتروزوگوانیدین و بالاتر هیچ سویه جهش‌یافته‌ای حاصل نشد. بیشترین تعداد کلنی‌های جهش‌یافته در غلظت ۲/۷۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از نیتروزوگوانیدین و زمان تیمار ۲۲/۵ دقیقه به دست آمد. همین‌طور مشخص شد که غلظت نیتروزوگوانیدین بر جهش‌زایی مؤثر بود ولی زمان تیمار کردن تأثیر چندانی نداشت. سویه جهش‌یافته‌ای که قادر به تولید بیشترین مقدار کوآنزیم Q<sub>10</sub> بود، ۵/۲ میلی‌گرم بر لیتر تولید داشت که ۲/۲ برابر بیشتر از سویه والدینی بود. براساس نتایج این پژوهش، نتیجه‌گیری می‌شود که با القای جهش به‌وسیله نیتروزوگوانیدین می‌توان در سویه *Gluconobacter oxydans* H621 سویه‌های جهش‌یافته‌ای را ایجاد کرد که قادر به تولید کوآنزیم Q<sub>10</sub> بیشتری نسبت به سویه والدینی باشند.

کلیدواژگان: کوآنزیم Q<sub>10</sub>، جهش، روش سطح پاسخ، نیتروزوگوانیدین، *Gluconobacter*

## ۱- مقدمه

کوانزیم Q10 تنها آنتی‌اکسیدان محلول در لیپیدها است که به‌وسیله انسان تولید می‌شود و تقریباً در همه غشاهای از غشای میتوکندری تا لیپوپروتئین‌های با چگالی بسیار کم یافت می‌شود. این مولکول می‌تواند از لیپوپروتئین‌ها و لیپیدها در برابر پراکسیداسیون و آسیب اکسیداتیو محافظت کند [۱]. کوانزیم Q10 در کنار آنتی‌اکسیدان‌های دیگری مانند ویتامین C و E، با رادیکال‌های آزاد تولیدشده از واکنش‌های میتوکندریایی مقابله می‌کند. با توجه به عملکردهای بی‌شمار و اهمیت فیزیولوژیکی آن، جای تعجب نیست که کمبود کوانزیم Q10 می‌تواند منجر به بیماری‌های زیادی شود. کوانزیم Q10 در سایر فرایندهای فیزیولوژیکی، از جمله اکسیداسیون سولفید، تنظیم نفوذپذیری منافذ میتوکندری و انتقال پروتون‌ها و یون کلسیم از خلال غشاهای بیولوژیکی نقش دارد [۲]؛ [۳]. طیف وسیعی از کاربردها برای کوانزیم Q10 در صنایع دارویی و آرایشی سبب شده است که تمایل زیادی برای تولید آن در مقیاس انبوه وجود داشته باشد. در اواخر دهه ۱۹۵۰، فردریک کرین برای اولین بار توانست کوانزیم Q10 را از یک قلب گاو جدا کند. از آن زمان به بعد، تلاش‌های صنعتی برای تولید کوانزیم Q10 بر سه روش استخراج از بافت حیوانی، سنتز نیمه‌شیمیایی و تخمیر میکروبی استوار بوده است [۴]. در روش تخمیر میکروبی، تاکنون سویه‌های مختلفی سنجش و بررسی شده‌اند. مقدار تولید کوانزیم Q10 به‌وسیله سویه‌های وحشی به‌طور عمده چشمگیر نمی‌باشد. از این‌رو راهکارهایی مختلفی برای افزایش تولید کوانزیم Q10 به‌وسیله این میکروارگانیسم‌ها استفاده شده است [۵]. برخی از این راهکارها شامل ایجاد جهش در سویه‌های تولیدکننده، افزودن پیش‌سازهای مناسب به محیط کشت باکتری‌های تولیدکننده، مهندسی متابولیک و بیان ژن‌های تولیدکننده کوانزیم Q10 در باکتری‌های میزبان مانند *E. coli*

در نهایت بهبود عملکرد تولید کوانزیم Q10 از راه بهبود شرایط رشد می‌باشد [۶].

ایجاد جهش در سویه‌ها برای افزایش تولید کوانزیم Q10 یکی از راه‌های موفق برای توسعه سویه جهت مقاصد صنعتی است. تشخیص سویه‌های جهش‌یافته‌ای که تولید کوانزیم Q10 در آنها افزایش یافته است، از راه‌های مختلفی انجام می‌گیرد. از آن جایی که کوانزیم Q10 جزئی از زنجیره تنفسی می‌باشد، افزودن مهارکننده‌های تنفس و یا مهارکننده‌های مسیر بیوستز کوانزیم Q10 می‌تواند از رشد باکتری جلوگیری کند. بنابراین باید سویه‌های جهش‌یافته‌ای را جستجو کرد که بتواند مقادیر بالاتری از کوانزیم Q10 را تولید کرده و در محیط کشت حاوی این مهارکننده‌ها رشد کند [۷].

در این پژوهش تولید کوانزیم Q10 در *Gluconobacter oxydans* H621 از راه ایجاد جهش شیمیایی با ماده نیتروزوگانیدین با استفاده از روش سطح پاسخ مورد بررسی قرار گرفت تا علاوه بر دستیابی به یک سویه جهش‌یافته که قادر به تولید مقادیر بیشتری از کوانزیم Q10 نسبت به سویه والدینی باشد، بتوان میزان تأثیر هر یک از عوامل مؤثر در ایجاد جهش شیمیایی (غلظت ماده جهش‌زا و زمان تیمار کردن) را مورد تحلیل آماری قرار داد.

## ۲- مواد و روش‌ها

میکروارگانیسم و محیط‌های کشت: باکتری استفاده‌شده در این پژوهش، *Gluconobacter oxydans* H621 از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی (PTCC) خریداری شد. این سویه بر محیط کشت GYC (گلوکز ۵۰ گرم بر لیتر، عصاره مخمر ۱۰ گرم بر لیتر، کربنات کلسیم ۳۰ گرم بر لیتر و آگار ۲۵ گرم بر لیتر) به مدت ۲-۳ ماه در دمای یخچال قابلیت نگهداری داشت و برای نگهداری طولانی مدت آن از دمای ۷۰- درجه سانتیگراد استفاده شد. محیط پیش‌کشت حاوی ۲۰ گرم بر لیتر

سوسپانسیون شد. سپس ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون را به لوله‌های حاوی ۵ میلی لیتر محیط کشت پیش کشت که حاوی ۱۶۰ میکروگرم بر میلی لیتر از منادیون بود، اضافه شد. لوله‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت گرماگذاری شدند. سپس ۰/۱ میلی لیتر از محتوای لوله‌ها به پلیت‌های GYC منتقل و کشت داده شد. بعد از ۷۲ ساعت، پلیت‌ها جهت رشد سویه‌های جهش‌یافته بررسی شدند. کلنیک‌هایی که قادر به رشد در پلیت‌ها بودند، به عنوان جهش‌یافته مناسب انتخاب شدند و تولید کوآنزیم Q10 در آنها بررسی شد [۹].

**استخراج و سنجش کوآنزیم Q10:** برای استخراج کوآنزیم Q10 نخست ۱ میلی لیتر از محیط کشت ۴۰ ساعته production culture با سرعت ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شدند تا سلول‌ها جدا شوند سپس با آب مقطر شستشو داده و ۴۵۰ میکرولیتر از محلول cell lytic B افزوده و نیم ساعت در دمای اتاق نگهداری شد تا سلول‌ها شکسته شوند. عمل استخراج در دو مرحله انجام شد. به این صورت که نخست ۹۰۰ میکرولیتر از حلال هگزان-۲ پروپانول با نسبت ۳-۵ به پلت حاصل از سانتریفوژ افزوده و پس از ۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. بعد از سانتریفوژ، بخش بالایی حاوی کوآنزیم Q10 به تیوب‌های تمیز منتقل شد. سپس تیوب‌ها در معرض هوای آزاد و دمای آزمایشگاه قرار داده شدند تا حلال‌ها بخار شده و پودر حاوی کوآنزیم Q10 باقی بماند. برای سنجش کوآنزیم Q10، پودر حاصل را در ۵۰۰ میکرولیتر اتانول HPLC grade حل کرده و ۲۰ میکرولیتر از آن به دستگاه HPLC (Agilent 1120, USA) تزریق شد. ستون استفاده شده Thermo scientist C18 با ابعاد (250 mm× 4.5 mm× 5 μm) متصل شده به دکتور UV بود و فاز متحرک اتانول: متانول (۷۰:۳۰) با سرعت جریان ۱ میلی لیتر بر دقیقه بود. کوآنزیم Q10 در طول موج ۲۷۵ نانومتر شناسایی شد [۱۰]. برای ترسیم

سوربیتول، ۳ گرم بر لیتر عصاره مخمر، ۳ گرم بر لیتر پپتون و محیط کشت تولید حاوی ۱۱۰ گرم بر لیتر سوربیتول، ۲۵ گرم بر لیتر عصاره مخمر، ۳۵ گرم بر لیتر پپتون، ۰/۵ گرم بر لیتر  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  و ۰/۵۵ گرم بر لیتر  $\text{MgSO}_4$  بود [۸]. همه آزمایش‌ها در فلاسک‌های ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت با pH ۶/۵ انجام شد. پس از تلقیح، فلاسک‌ها به مدت ۴۰ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد با سرعت ۱۸۰ rpm در انکوباتور نگهداری شدند. کوآنزیم Q10 بعد از ۴۰ ساعت در آغاز فاز سکون استخراج شد.

**بافر جهش‌زایی:** ترکیب‌های بافر استفاده شده در این پژوهش با نام بافر جهش‌زایی به این صورت می‌باشد: ۱۲۵ میلی گرم  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ، ۱۲۲ میلی گرم  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ، ۴۲ میلی گرم  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۶ میلی گرم  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ، ۰/۴۸ میلی گرم  $\text{FeCl}_3$ ، ۰/۶ میلی گرم  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ، ۰/۲ میلی گرم  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ، ۱۳۴ میلی گرم  $\text{NH}_4\text{Cl}$  و ۱ لیتر آب مقطر با pH برابر با ۶/۵ [۹].

**جهش‌زایی:** برای ایجاد جهش در سویه H621 از ماده جهش‌زای نیتروزوگوانیدین یا (N-methyl-) NTG ( $\text{N}^7$ -nitro-N-nitrosoguanidine) استفاده شد. به این منظور ۲ میلی لیتر از محیط کشت ۱۸ ساعته باکتری که در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد رشد کرده است، استفاده شد و با سرعت ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. بعد از جداکردن رسوب سلولی، ۲ بار با بافر جهش‌زایی شستشو داده شد. پس از شستشو، باکتری‌ها با غلظت نیم مک فارلند در بافر جهش‌زایی، سوسپانسیون شدند. پس از تهیه سوسپانسیون باکتری، غلظت‌های مختلفی از نیتروزوگوانیدین در زمان‌های مختلف تأثیرگذاری بر اساس طرح مرکب مرکزی به روش سطح پاسخ استفاده شدند (جدول ۱). سپس واکنش به وسیله رقیق کردن سوسپانسیون به نسبت ۱:۱۰ با آب متوقف شد. بعد از این مرحله، ۲ بار شستشو با بافر جهش‌زایی انجام شد و در نهایت رسوب باکتری دوباره در بافر جهش‌زایی

منحنی استاندارد، نمونه کوآنزیم Q10 استاندارد نیز با شماره CAS ۳۰۳-۹۸-۰ و مخصوص HPLC با درجه خلوص بالای ۹۸ درصد از شرکت سیگما-آلدریچ خریداری و استفاده شد.

**تعیین وزن خشک سلولی و ظرفیت ویژه کوآنزیم Q10**: همزمان با استخراج کوآنزیم Q10، ۱ میلی لیتر از محیط کشت را نیز جهت تعیین وزن خشک سلولی با سرعت ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ کرده تا سلولها جدا شوند. پس از شستشو، سلولها درون آون با دمای ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. ظرفیت ویژه تولید، مقدار کوآنزیم Q10 را در هر گرم از وزن خشک سلولی نشان می دهد. برای محاسبه ظرفیت ویژه کوآنزیم Q10 کافی است تا مقدار کوآنزیم Q10 را بر وزن خشک سلولی تقسیم کرد [۸].

**آنالیز آماری**: به منظور بررسی اثر جهش‌زایی نیتروزوگوانیدین، از روش سطح پاسخ (RSM) با طرح

مرکب مرکزی شامل دو عامل استفاده شد. این عوامل که به‌عنوان متغیرهای مستقل در نظر گرفته می‌شوند، عبارتند از غلظت نیتروزوگوانیدین (NTG) و زمان تیمارکردن (Time). تعداد کلنی‌های شمارش شده (Colony Count) در پلیت‌های حاوی منادیون نیز به‌عنوان متغیر پاسخ در نظر گرفته شد. تمام تحلیل‌های آماری مربوط به RSM از جمله پیاده‌سازی طرح مرکب مرکزی و تحلیل واریانس (ANOVA) با استفاده از نرم‌افزار Minitab ویرایش ۱۸/۱ انجام شد [۱۱]. در جدول ۱، سطوح مختلف متغیرهای مستقل در طرح مرکب مرکزی نشان داده شده‌اند. جدول ۲ نیز داده‌های مربوط به ۱۳ آزمایش انجام شده به کمک طرح مرکب مرکزی را که برای تحلیل‌های آماری به کار برده شده است، نشان می‌دهد. لازم به ذکر است که تمام آزمون‌های آماری مربوط به ANOVA و ضرایب رگرسیونی در سطح ۰/۰۵ انجام شده است.

جدول ۱ سطوح مختلف متغیرهای مستقل در طرح مرکب مرکزی

سطوح					متغیرها
-۱/۴۱۴۲۱	-۱	۰	۱	۱/۴۱۴۲۱	
۲/۷۹	۳	۳/۵	۴	۴/۲۱	غلظت NTG (mg/mL)
۱۱/۸۹	۱۵	۲۲/۵	۳۰	۳۳/۱۲	زمان (دقیقه)

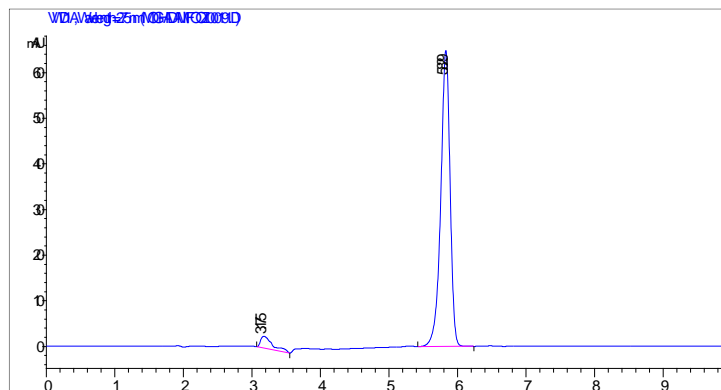
جدول ۲ مقادیر متغیرهای مستقل و پاسخ در طرح مرکب مرکزی

شماره اجرا	غلظت NTG (mg/mL)	زمان (دقیقه)	تعداد کلنی
۱	۳/۵	۲۲/۵	۸
۲	۳	۱۵	۲۰
۳	۳/۵	۲۲/۵	۱۰
۴	۳/۵	۲۲/۵	۱۱
۵	۴	۳۰	۰
۶	۳/۵	۲۲/۵	۵
۷	۳/۵	۳۳/۱۲	۸
۸	۳/۵	۲۲/۵	۹
۹	۴/۲۱	۲۲/۵	۰
۱۰	۳	۳۰	۲۳
۱۱	۳/۵	۱۱/۸۹	۱۲
۱۲	۲/۷۹	۲۲/۵	۳۱
۱۳	۴	۱۵	۰

### ۳- نتایج

کوآنزیم Q<sub>10</sub> به وسیله دستگاه HPLC و در طول موج ۲۷۵ نانومتر انجام گرفت. شکل ۱ کروماتوگرام آنالیز HPLC برای کوآنزیم Q<sub>10</sub> استاندارد را نشان می دهد که از شرکت Sigma-Aldrich خریداری شد. همان طور که در شکل دیده می شود، پیک کوآنزیم Q<sub>10</sub> استاندارد در زمان بازداری ۵/۸ دقیقه ترسیم شده است.

سنجش کوآنزیم Q<sub>10</sub>: تولید کوآنزیم Q<sub>10</sub> در فلاسک های ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت با pH ۶/۵ و دمای ۳۰ درجه سانتیگراد با سرعت ۱۸۰ rpm انجام شد. سپس کوآنزیم Q<sub>10</sub> استخراج شد. پس از ترسیم منحنی استاندارد کوآنزیم Q<sub>10</sub>، میزان تولید کوآنزیم Q<sub>10</sub> به وسیله سویه های جهش یافته به دست آمد. شناسایی



شکل ۱ کروماتوگرام آنالیز HPLC برای کوآنزیم Q<sub>10</sub> استاندارد. پیک موجود در زمان بازداری ۵/۸ دقیقه نشان دهنده کوآنزیم Q<sub>10</sub> است. کوآنزیم Q<sub>10</sub> استاندارد از شرکت Sigma-Aldrich با CAS number: 303-98-0 (≥98%- HPLC)

کوآنزیم Q<sub>10</sub> و ظرفیت ویژه تولید کوآنزیم Q<sub>10</sub> تولید شده به وسیله ۲۰ سویه جهش یافته انتخابی را نشان می دهد. همان طور که در جدول قابل مشاهده است، مقادیر کوآنزیم Q<sub>10</sub> تولید شده به وسیله برخی از سویه های جهش یافته تفاوت چندانی با سویه والدینی نداشتند. بیشترین میزان کوآنزیم Q<sub>10</sub> به وسیله سویه M12 تولید شد که برابر با ۵/۲ میلی گرم بر لیتر بود.

انتخاب جهش یافته مناسب: با انجام جهش با غلظت ها و زمان های مختلف تیمار بر سویه H621، در نهایت ۱۳۷ کلنی جهش یافته به دست آمد (جدول ۲). به دلیل تعداد زیاد کلنی های جهش یافته، امکان بررسی تولید کوآنزیم Q<sub>10</sub> در تک تک آنها وجود نداشت. از این رو ۲۰ سویه به صورت تصادفی انتخاب شدند و تولید کوآنزیم Q<sub>10</sub> به وسیله آنها سنجش شد. جدول ۳ میزان

جدول ۳ میزان کوآنزیم Q<sub>10</sub> و ظرفیت ویژه تولید کوآنزیم Q<sub>10</sub> تولید شده به وسیله سویه های جهش یافته

ظرفیت ویژه تولید کوآنزیم Q <sub>10</sub> (mg/gDCW)	کوآنزیم Q <sub>10</sub> (mg/l)	سویه جهش یافته
۰/۵۰	۲/۳ ± ۰/۰۳	سویه H621
۰/۸۳	۴/۴ ± ۰/۰۲	M1
۰/۹۸	۴/۵ ± ۰/۱۲	M2
۰/۴۳	۲/۳ ± ۰/۰۲	M3

۰/۷۰	±۳/۳ ۰/۲۳	M4
۰/۰۴	۱/۵ ± ۰/۰۳	M5
۰/۶۵	۳/۴ ± ۰/۲۱	M6
۰/۴۵	۲/۷ ± ۰/۰۴	M7
۰/۰۴	۰/۱۷ ± ۰/۰۹	M8
۰/۷۷	۴/۳ ± ۰/۰۲	M9
۰/۴۶	۲/۹ ± ۰/۰۴	M10
۰/۵۰	۲/۷ ± ۰/۰۸	M11
۱/۲۱	۵/۲ ± ۰/۲	M12
۰/۵۰	۲/۷ ± ۰/۱	M13
۰/۵۷	۳/۴ ± ۰/۰۹	M14
۰/۴۷	۳/۰ ± ۰/۰۴	M15
۱/۱	۴/۸ ± ۰/۲	M16
۰/۱۰	۰/۲۹ ± ۰/۲	M17
۰/۰۴	۰/۲۷ ± ۰/۱	M18
۰/۵۰	۲/۷ ± ۰/۰۳	M19
۰/۵۴	۳/۳ ± ۰/۰۳	M20

ها نشان دهنده ضرایب اثرهای خطی هستند. در مدل بالا  $b_{ij}$  و  $b_{ii}$  ها به ترتیب نشان دهنده ضرایب اثرهای توان دوم و ضرایب اثرهای متقابل هستند.

به منظور بررسی اثر جهش‌زایی نیتروزوگوانیدین با استفاده از روش سطح پاسخ، مدل رگرسیونی به دست آمد که در آن NTG و Colony Count به ترتیب نشان دهنده غلظت نیتروزوگوانیدین و تعداد کلنی است. براساس معادله به دست آمده زمان تیمار کردن بر جهش‌زایی بی تأثیر بوده و فقط غلظت نیتروزوگوانیدین مؤثر است:

$$\text{Colony Count} = ۸/۳۹ - ۱۰/۸۵۵ \text{ NTG} + ۲/۹۲۴ (\text{NTG})^2$$

در جدول ۴، نتایج مربوط به ANOVA مدل رگرسیونی با متغیر مستقل غلظت نیتروزوگوانیدین نشان داده شده است. با مقایسه P-Value با سطح معناداری ۰/۰۵ می‌توان نتیجه گرفت که اثر خطی و مربعی متغیر مستقل غلظت نیتروزوگوانیدین از نظر آماری معنادار

**پایداری سویه‌های جهش یافته:** همه ۲۰ سویه بررسی در فریزر -۷۰ درجه سانتیگراد ذخیره‌سازی شدند. پس از ذخیره‌سازی، تولید کوآنزیم Q10 به وسیله سویه M12 دوباره طی سه نسل بررسی شد. تولید کوآنزیم Q10 در سویه M12 بعد از نسل دوم به‌طور چشمگیری کاهش پیدا کرد و به ۳/۲ میلی‌گرم بر لیتر رسید.

**آنالیز آماری:** برای بررسی آماری اثر غلظت نیتروزوگوانیدین و زمان تیمار بر جهش‌زایی در سویه H621، از روش آماری سطح پاسخ استفاده شد. پس از انجام ۱۳ آزمایش، ۱۳۷ کلنی جهش یافته به دست آمد که برای ۳ آزمایش هیچ کلنی به دست نیامد (جدول ۲). مدل رگرسیونی به کاررفته در RSM به صورت زیر است:

$$Y = b_0 + \sum b_i X_i + \sum b_{ii} X_i^2 + \sum_i \sum_j b_{ij} X_i X_j$$

وقتی که Y متغیر پاسخ بوده و  $X_i$  ها متغیرهای مستقل یا همان عوامل هستند.  $b_0$  جمله ثابت بوده و  $b_i$

هستند ( $P\text{-value} > 0.05$ ). بنابراین عامل غلظت نیتروزوگوانیدین در تعداد کلنی‌ها تأثیرگذار است. لازم به ذکر است که مقدار ضریب تعیین تعدیل یافته مدل

رگرسیونی برابر با ۹۵/۱۷ درصد است و نشان‌دهنده قدرت بالای آن در مدل‌سازی و برازش داده‌ها است.

جدول ۴ جدول ANOVA با متغیر مستقل نیتروزوگوانیدین

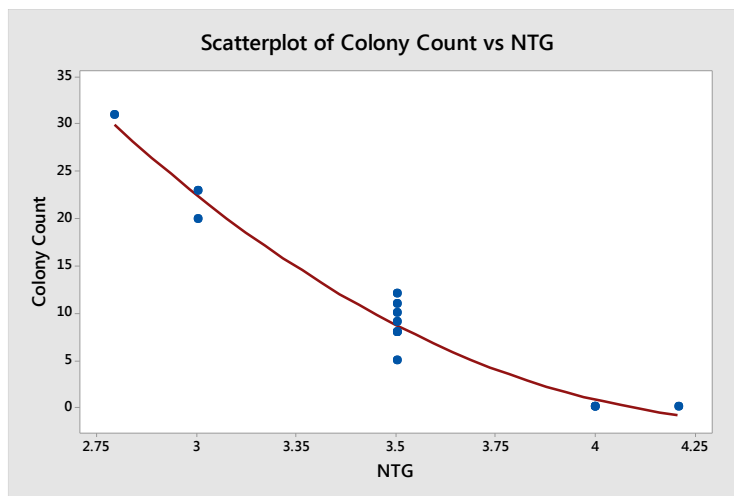
منبع	درجه آزادی	مجموع مربعات تصحیح‌شده	میانگین مربعات تصحیح‌شده	F-Value	P-Value
مدل	۲	۱۰۳/۱۶	۵۰/۵۸۲	۱۱۹/۲۴	۰/۰۰۰
خطی	۱	۹۴/۶۶	۹۴/۶۶	۲۲۴/۰۹	۰/۰۰۰
NTG	۱	۹۴/۶۶	۹۴/۶۶	۲۲۴/۰۹	۰/۰۰۰
مربعی	۱	۶۰/۵	۶۰/۵۰۳	۱۴/۳۸	۰/۰۰۴
(NTG) <sup>۲</sup>	۱	۶۰/۵	۶۰/۵۰۳	۱۴/۳۸	۰/۰۰۴
خطا	۱۰	۴۲/۰۷	۴/۲۰۷		
عدم برازش	۶	۲۰/۸۷	۳/۴۷۸	۰/۶۶	۰/۶۹۳
خطای خالص	۴	۲۱/۲	۵/۳		
کل	۱۲	۱۰۴۵/۲۳			

می‌شود. این موضوع در شکل ۲ به وضوح قابل رؤیت است. در این شکل، نمودار پراکنش تعداد کلنی در مقابل غلظت نیتروزوگوانیدین به همراه منحنی مربوط به مدل رگرسیونی رسم شده است. شکل ۳ اثر همزمان غلظت نیتروزوگوانیدین و زمان‌های مختلف تیمار بر تعداد کلنی‌های حاصل را نشان می‌دهد. همان‌طور که در شکل دیده می‌شود، اثر متقابل غلظت نیتروزوگوانیدین و زمان‌های مختلف تیمار، از نظر آماری معنادار نیستند؛ یعنی عامل زمان در تعداد کلنی‌ها بی‌تأثیر می‌باشد.

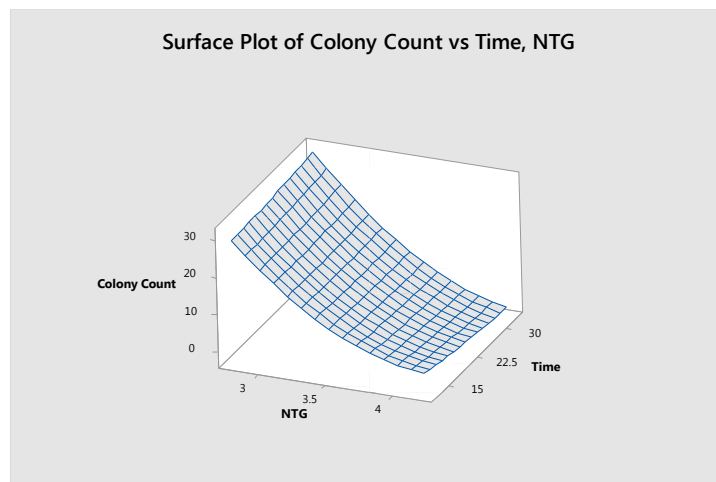
در جدول ۵ مقدار برآورد ضرایب مدل رگرسیونی، به همراه P-Value و T-Value نشان داده شده است. مقادیر P-Value این جدول نیز تأیید می‌کند که همه ضرایب مدل رگرسیونی از نظر آماری معنادار هستند ( $P\text{-value} < 0.05$ ). نکته قابل توجه در مدل رگرسیونی این است که ضریب نیتروزوگوانیدین منفی بوده ولی ضریب توان دوم این متغیر، مثبت است. این به آن معنا است که با افزایش غلظت نیتروزوگوانیدین، تعداد کلنی کاهش پیدا می‌کند ولی شدت این کاهش ثابت نبوده و به تدریج کم

جدول ۵ برآورد ضرایب رگرسیونی

مؤلفه	ضریب	خطای معیار ضریب	T-Value	P-Value
ثابت	۸/۷۳۹	۰/۷۴۱	۱۱/۸	۰/۰۰۰
NTG	-۱۰/۸۵۵	۰/۷۲۵	-۱۴/۹۷	۰/۰۰۰
(NTG) <sup>۲</sup>	۲/۹۲۴	۰/۷۷۱	۳/۷۹	۰/۰۰۴



شکل ۲ نمودار پراکنش تعداد کلنی در مقابل غلظت نیتروزوگوانیدین به همراه منحنی رگرسیون



شکل ۳ نمودار اثر همزمان غلظت نیتروزوگوانیدین و زمان های مختلف تیمار بر تعداد کلنی های حاصل

#### ۴- بحث

با اتم‌های آهن [۱۵؛ ۱۶]، پرتوافکنی یون‌های کم‌انرژی با یون‌های نیتروژن [۱۷] و جهش شیمیایی [۹؛ ۱۸]. در ایجاد جهش در باکتری‌ها برای افزایش تولید کوآنزیم Q<sub>10</sub> در اغلب موارد از ماده نیتروزوگوانیدین استفاده شده است [۱۹؛ ۲۰]. این ماده جزء عوامل الکیله‌کننده محسوب می‌شود که جهش‌های نقطه‌ای ایجاد می‌کند و با انتقال گروه متیل بر بازهای مختلف سبب جفت‌شدن اشتباهی بازها با یکدیگر می‌شود [۲۱]. این ماده در جهش سوبیه‌های *Gluconobacter* نیز برای افزایش تولید دی هیدروکسی استن [۲۲]، تارتاریک اسید [۲۳] و

یکی از راهکارهای موفق برای توسعه سوبیه جهت مقاصد صنعتی جهش‌زایی در آنها می‌باشد. هنوز مشخص نشده است که چرا سوبیه‌های جهش‌یافته قادرند کوآنزیم Q<sub>10</sub> بیشتری تولید کنند، زیرا ۲۲ ژن در مسیر تولید کوآنزیم Q<sub>10</sub> به‌وسیله باکتری‌ها وجود دارد و معلوم نیست که جهش‌ها روی کدام یک از ژن‌ها تأثیر می‌گذارند [۱۲]. برای جهش‌زایی در باکتری‌ها به‌منظور افزایش تولید کوآنزیم Q<sub>10</sub>، روش‌های مختلفی تاکنون به کار رفته است، مانند استفاده از اشعه UV [۱۳]، اشعه گاما [۱۴]، بمباران



آسکوربیک اسید [۱۵] استفاده شده است. از این رو در این پژوهش نیز برای ایجاد جهش شیمیایی در سویه H621 جهت افزایش تولید کوآنزیم Q<sub>10</sub> از نیتروزوگوانیدین استفاده شد. برای تشخیص سویه‌های جهش یافته مناسب نیز از منادیون (ویتامین K<sub>3</sub>) که آنالوگ کوآنزیم Q<sub>10</sub> است، استفاده شد. این ماده می‌تواند جایگزین کوآنزیم Q<sub>10</sub> در غشای باکتری شده و عمل تنفس را بلوکه کند. از این رو کلنی‌های رشد کرده در محیط منادیون معمولاً جهش‌هایی را حاصل کرده‌اند که توانایی تولید کوآنزیم Q<sub>10</sub> را بیش از سویه والدینی در آنها به وجود آورده است [۹؛ ۱۸].

مشخص شده است که شرایط تیمار کردن اثر عمده‌ای بر جهش‌زایی دارد. فاکتورهایی از قبیل pH، ترکیب بافر، غلظت ماده جهش‌زا، زمان تیمار کردن و مرحله رشدی میکروارگانیزم ممکن است تأثیر زیادی بر بازده این فرایند داشته باشد [۲۴]. از این رو در این پژوهش تولید کوآنزیم Q<sub>10</sub> به وسیله سویه H621 از راه ایجاد جهش شیمیایی با ماده نیتروزوگوانیدین با استفاده از روش سطح پاسخ بررسی شد تا علاوه بر دستیابی به یک سویه جهش یافته (که قادر به تولید مقادیر بیشتری از کوآنزیم Q<sub>10</sub> نسبت به سویه والدینی باشد) بتوان میزان تأثیر عوامل مؤثر در ایجاد جهش شیمیایی، یعنی غلظت ماده جهش‌زا و زمان تیمار کردن را مورد تحلیل آماری قرار داد. در بررسی اثر نیتروزوگوانیدین بر جهش‌زایی سویه H621، معادله رگرسیونی به دست آمده نشان داد که استفاده از غلظت‌های مختلف نیتروزوگوانیدین بر جهش‌زایی یا تعداد کلنی‌های جهش یافته که قادرند در محیط کشت حاوی منادیون رشد کنند، تأثیر چشمگیری دارد. اما استفاده از زمان‌های مختلف تیمار کردن بر جهش‌زایی بی‌تأثیر بود.

در بین جهش یافته‌های حاصل، سویه M12 بیشترین مقدار تولید کوآنزیم Q<sub>10</sub> را داشت. این جهش یافته قادر به تولید ۵/۲ میلی‌گرم بر لیتر کوآنزیم Q<sub>10</sub> بود. تولید

کوآنزیم Q<sub>10</sub> در این جهش یافته، ۲/۲ برابر بیش از سویه والدینی بود. اگرچه جهش در این سویه سبب افزایش تولید کوآنزیم Q<sub>10</sub> شد ولی تولید آن در مقایسه با سویه‌های جهش یافته‌ای که در پژوهش‌های دیگر به دست آمده است، بسیار اندک است. بیشترین مقدار کوآنزیم Q<sub>10</sub> که تاکنون از راه جهش به دست آمده است، برابر با ۷۷۰ میلی‌گرم بر لیتر است که به وسیله سویه جهش یافته‌ای از *A.tumefaciens* تولید شده است. این بازده بر اثر بهینه‌سازی شرایط رشد باکتری از جمله منبع کربن و نیتروژن و پتانسیل اکسید و احیا در فرماتور fed-batch با حجم ۸۰ هزار لیتر بعد از ۱۵۰ ساعت به دست آمد [۲۵؛ ۲۶]. جهش یافته دیگری با نام *R.sphaeroides* KY4113 قادر است ۳۵۰ میلی‌گرم بر لیتر در شرایط هوادهی محدود، کوآنزیم Q<sub>10</sub> تولید کند که ۲/۸ برابر سویه والدینی می‌باشد. این سویه قدرت تولید رنگدانه‌های خود را که جزء آنتی‌اکسیدان‌های آن محسوب می‌شود، از دست داده و از این رو با افزایش تولید کوآنزیم Q<sub>10</sub> کمبود رنگدانه‌ها را جبران می‌کند [۲۷]. سویه *A.tumefaciens* ATCC4452 در زمان تولید کوآنزیم Q<sub>10</sub> مقادیر زیادی پلی‌ساکارید خارج سلولی تولید می‌کرد که سبب افزایش ویسکوزیته محیط کشت شده و در نهایت بر عملیات استخراج تأثیر منفی می‌گذاشت. جهش یافته‌هایی از این سویه به دست آمد که در حدود ۳-۶ برابر کمتر محیط کشت خود را ویسکوز می‌کردند و سبب افزایش استخراج کوآنزیم Q<sub>10</sub> می‌شدند [۱۲]. جهش یافته دیگری از *A.tumefaciens* KA-3085 که M37 نام دارد و جهش یافته مقاوم به L-اتیونین می‌باشد، قادر است ۱۸۰ میلی‌گرم بر لیتر کوآنزیم Q<sub>10</sub>، یعنی ۱/۸ برابر سویه والدینی تولید کند [۹]. جدول ۶ مقایسه میزان کوآنزیم Q<sub>10</sub> تولید شده به وسیله سویه‌های جهش یافته در دیگر مطالعه‌ها و پژوهش حاضر را نشان می‌دهد.

کوآنزیم Q<sub>10</sub> در سویه M12 در این پژوهش بعد از ۲ نسل کاهش پیدا کرد. به نظر می‌آید که از دست دادن قدرت تولید کوآنزیم Q<sub>10</sub>، با عمل واریشن (variation) در این سویه مرتبط باشد که در جنس *Gluconobacter* به‌وفور دیده می‌شود.

از موارد دیگری که در مورد سویه‌های جهش‌یافته اهمیت دارد، پایدار بودن سویه جهش‌یافته حاصل است. در پژوهشی که Yuan و همکارانش انجام دادند، سویه جهش‌یافته‌ای از *A.tumefaciens* که قادر به تولید ۱/۵ برابر کوآنزیم Q<sub>10</sub> بیشتر نسبت به سویه والدینی بود، بعد از ۱۰ نسل همچنان تولید ثابتی داشت [۱۸]. قدرت تولید

جدول ۶ میزان کوآنزیم Q<sub>10</sub> تولیدشده به‌وسیله سویه‌های جهش‌یافته در مطالعه‌های دیگر و پژوهش حاضر

سویه جهش‌یافته	کوآنزیم Q <sub>10</sub> (mg/l)	ظرفیت ویژه تولید (mg/l DCW)	چند برابر	رفرنس
<i>R.spheroides</i> KY-8598	۷۷۰	۱۴/۵	-	Sakato 1992
<i>A.tumefaciens</i> KCCM 10413	۴۵۸	۸/۵	-	Ha 2007
<i>R.spheroides</i> Co-22-11	۳۴۶	۸/۷	۲/۶	Yoshida 1998
<i>A.tumefaciens</i> AU-55	۱۸۵	۵	۲	Yoshida 1998
<i>A.tumefaciens</i> M-37	۱۸۰	۴/۵	۱/۸	Yoshida 1998
<i>A.tumefaciens</i> KY-8593	۷۵	-	۱/۲	Kuratsu 1985
<i>G.oxydans</i> H621-M12	۵/۲	۱/۲	۲/۲	پژوهش حاضر

Cell Fact (2017) 16:39. DOI 10.1186/s12934-017-0646-4

[5] Kapoor P, Kapoor Kh (2013) Coenzyme Q10-a novel molecule. JIASM 14(1): 37-45

[6] Choi JH, Ryu YW, Seo JH (2005) Biotechnological production and applications of coenzyme Q<sub>10</sub>. Appl Microbiol Biotechnol 68:9-15. Doi: 10.1007/s00253-005-1946-x

[7] Cluis CP, Pineda D, Martin VJ (2012) The Production of coenzyme Q10 in microorganisms. Subcell Biochem 64:303-26. doi: 10.1007/978-94-007-5055-5\_15.

[8] Moghadami F (2020) The Effect of Pepper Extract on Coenzyme Q10 Production by *Gluconobacter japonicus* FM10. Modares J Biotechnol. Accepted

[9] Yoshida H, Kotani Y, Ochiai K, Araki K (1998) Production of ubiquinone-10 using bacteria. J General and Appl Microbiol 44 (1): 19-26

[10] Cluis CP, Ekins A, Narcross L, Jiang H, Gold ND, Burja AM, Martin VJJ (2011) Identification of bottlenecks in *E.coli*

سپاسگزاری: با سپاس فراوان از گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی دانشگاه الزهراء در خصوص امکانات مرتبط با دستگاه HPLC.

## ۵- منابع

[1] Mu F, Luo M, Fu Y, Zhang X, Yu P, Zu Y. Synthesis of the key intermediate of coenzyme Q10. Molecules. 2011; 16:4097-103

[2] Kobori Y, Ota S, Sato R, Yagi H, Soh S, Arai G, Okada H. Antioxidant cosupplementation therapy with vitamin C, vitamin E, and coenzyme Q10 in patients with oligoasthenozoospermia. Arch Ital Urol Androl. 2014; 86:1-4

[3] Bogeski I, Gulaboski R, Kappl R, Mirceski V, Stefova M, Petreska J, Hoth M. Calcium binding and transport by coenzyme Q. J Am Chem Soc. 2011;133:9293-303.

[4] Sean Qiu En Lee, Tsu Soo Tan, Makoto Kawamukai Ee Sin Chen. Cellular factories for coenzyme Q10 production. Lee et al. Microb

- Components on the Formation of Coenzyme Q Homologs by *Pseudomonas* N842 and Mutants. *Agric. BioI. Chem.* 45 (10): 2175-2182
- [20] Kuratsu Y, Sakurai M, Hagino H, Inuzuka K (1984) Productivity and Colony Morphology Associated with Coenzyme Q10 Production by *Agrobacterium* Species. *Agric. BioI. Chem.* 48 (8): 1997-2002
- [21] Najafi M, Pezeshki P (2013) Bacterial Mutation; Types, Mechanisms and Mutant Detection Methods: a Review. *European Sci J* 4(4):628-638
- [22] Ma L, Lu W, Xia Z, Wen J (2010) Enhancement of dihydroxyacetone production by mutant of *Gluconobacter oxydans*. *Biochem Eng J* 49: 61-67
- [23] Kotera U, Umehara K, Kodama T (1972) Isolation method of highly tartaric acid producing mutants of *Gluconobacter suboxydans*. *Agr Biol Chem* 36(8) : 1307-1313
- [24] Crueger W, Crueger A (1990). *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology*. Mortazavi A, Karimi M. Ferdowsi university press. 1376, pp:43-45
- [25] Sakato K, Tanaka H, Shibata S, Kuratsu Y (1992) Agitation-aeriation studies on coenzyme Q10 production using *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *Biotechnol Appl Biochem* 16:19-22
- [26] Ha SJ, Kim SY, Seo JH, Oh DK, Lee JK (2007) Optimization of culture conditions and scale-up to pilot and plant scales for Coenzyme Q10 production by *Agrobacterium tumefaciens*. *Appl Microbiol Biotechnol* 74:974-980
- [27] Kien NB, Kong IS, Lee MG, Kim JK(2010) Coenzyme Q10 production in a 150-l reactor by a mutant strain of *Rhodobacter sphaeroides*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 37(5):521-9.
- engineered for the production of CoQ10. *Metabol Engin* 13:733-744
- [11] Minitab 18 Statistical Software (2017). [Computer software]. State College, PA: Minitab, Inc. (www.minitab.com).
- [12] Ndikubwimana JD, Lee BH (2014) Enhanced production techniques, properties and uses of Coenzyme Q10. *Biotechnol Lett.* DOI:10.1007/s10529-014-1587-1
- [13] Qi Zh, Wang W, Yang H, Xia X, Yu X (2014) Mutation of *Acetobacter pasteurianus* by UV irradiation under acidic stress for high-acidity vinegar fermentation. *Int J Food Sci Technol* 49: 468-476
- [14] Najafi N, Hosseini R, Ahmadi A (2011) Impact of gamma rays on the *Phaffia rhodozyma* genome revealed by RAPD-PCR. *Iranian J Microbiol* 3(4) 216-221
- [15] Xu A, Yao J, Yu L, Lv S, Wang J, Yan B, Yu Z (2004) Mutation of *Gluconobacter oxydans* and *Bacillus megaterium* in a two-step process of L-ascorbic acid manufacture by ion beam. *J Appl Microbiol.* 96: 1317-1323
- [16] Bing Y, An X, Wan Zh, Wei Zh, Jun W (2006) Accumulation of 2-Keto-L-Gulonate at 33°C by a Thermotolerant *Gluconobacter Oxydans* Mutant Obtained by Ion Beam Implantation. *Plasma Sci. Technol.* 8 237
- [17] Jeya M, Moon HJ, Lee JL, Kim IW, Lee JK (2010) Current state of Coenzyme Q<sub>10</sub> production and its application. *Appl Microbiol Biotechnol* 85: 1653-1663
- [18] Yuan Y, Tian Y, Yue T (2012) Improvement of Coenzyme Q10 Production: Mutagenesis Induced by High Hydrostatic Pressure Treatment and Optimization of Fermentation Conditions. *J Biomed Biotechnol.* doi:10.1155/2012/607329
- [19] Natori Y, Nagasaki T (1981) Enhancement of Coenzyme Q10 Accumulation by Mutation and Effects of Medium

# Improvement of the coenzyme Q<sub>10</sub> production by *Gluconobacter oxydans* H621 through chemical mutation and evaluation of the mutagenesis of nitrosoguanidine using the response surface methodology

Foozieh Moghadami<sup>1\*</sup>, Mahdi Kalantari<sup>2</sup>

1. Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran
2. Department of Statistics, Payame Noor University, Tehran, Iran

\*Corresponding Author: fmoghadami@pnu.ac.ir

Receipt: 2021/03/02

Accepted: 2021/09/20

## Abstract

Mutation in microbial strains to increase coenzyme Q<sub>10</sub> production is one of the successful strategies for strain development. Therefore, in this study, the production of coenzyme Q<sub>10</sub> by *Gluconobacter oxydans* H621 was investigated through chemical mutation with nitrosoguanidine using the response surface methodology. Nitrosoguanidine was used to induce mutations at different concentrations (2.79 - 4.21 mg/mL) and treatment times (11.89 – 33.12 minutes), which was designed by a central composite design. The detection of mutant strains was investigated through their ability to grow in medium containing 160 µg/mL of menadione. The mutant strains were then examined for coenzyme Q<sub>10</sub> and dry cell weight production. The results showed that no mutant strains were obtained at a concentration of 4 mg/ml and above. The highest number of mutant colonies was obtained at a concentration of 2.79 mg/mL of nitrosoguanidine and treatment time of 22.5 minutes. It was also found that the concentration of nitrosoguanidine was effective on mutagenesis but the treatment time had a little effect. The mutant strain that was able to produce the highest amount of coenzyme Q<sub>10</sub> produced 5.2 mg/L, which was twice as much as the parent strain. According to the results of this study, it is concluded that by inducing mutation using nitrosoguanidine, mutant strains can be generated in *Gluconobacter oxydans* H621 that are able to produce more coenzyme Q<sub>10</sub> than the parent strain.

**Keywords:** Coenzyme Q<sub>10</sub>, Mutation, response surface methodology, Nitrosoguanidine, *Gluconobacter*